



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

**INDIRIZZO IN GENETICA MEDICA, MALATTIE METABOLICHE E
NUTRIGENOMICA**

XXVIII CICLO

**Studio dell'effetto del fumo di sigaretta sul sistema
immunitario nella popolazione dell'Ogliastra**

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Francesco Cucca

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Valentina Serra

Co-Tutor:

Dott.ssa Valeria Orrù

Anno Accademico 2014 - 2015

INDICE

1. RAZIONALE	3
2. INTRODUZIONE	4
3. DISEGNO SPERIMENTALE	13
4. MATERIALI E METODI	15
4.1 POPOLAZIONE OGGETTO DELLO STUDIO: IL PROGETTO PROGENIA/SARDINIA	15
4.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO IMMUNOLOGICO	15
4.2.1 PROTOCOLLO LYSE NO WASH	19
4.2.2 PROTOCOLLO LYSE-WASH	19
4.2.3 SETTAGGIO STRUMENTALE DEI CITOFLUORIMETRI	19
4.2.4 RIPRODUCIBILITÀ DELLE MISURAZIONI	20
4.3 TEST FUNZIONALI	26
4.3.1 RACCOLTA E CRIOCONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	26
4.3.2 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE	27
4.3.3 SAGGIO DI PRODUZIONE CITOCHINICA	29
4.3.4 QUANTIFICAZIONE DI CITOCHINE NEL SURNATANTE	30
4.4 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO	32
4.5 QUANTIFICAZIONI DEI MARCATORI SIERICI DI PROLIFERAZIONE, ATTIVAZIONE E INFIAMMAZIONE: sBAFF, sCD25, IL-6, MCP-1, PCR	33
4.6 QUANTIFICAZIONE SIERICA DELLE IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE A, G, M ED E	34
4.7 ANALISI STATISTICHE	35
5. RISULTATI	36
6. DISCUSSIONE	42
7. BIBLIOGRAFIA	46

1. RAZIONALE

Nella presente tesi è stato valutato l'effetto del fumo di sigaretta a livello sistemico sulle popolazioni cellulari che compongono il sistema immunitario umano con lo scopo di identificare le cellule maggiormente alterate quantitativamente dal fumo e studiare la funzionalità delle stesse. Questo approccio permetterà di comprendere meglio il contributo del fumo nell'insorgenza di patologie ad esso collegate. Le opinioni spesso discordanti presenti in letteratura sugli effetti del fumo esercitati sul sistema immunitario evidenziano che per valutare un fattore ambientale così variabile ed eterogeneo sia importante una caratterizzazione fine del sistema immunitario in un numero considerevole di individui che vivono in condizioni ambientali quanto più omogenee possibile. I risultati che verranno discussi saranno per questo riferiti ad un elevato numero di individui (circa 1,600 volontari) il cui profilo immunologico è stato caratterizzato finemente, analizzando quantitativamente un centinaio di sottopopolazioni leucocitarie circolanti nel sangue periferico. Le cellule maggiormente alterate quantitativamente sono state analizzate attraverso test funzionali che includono saggi di proliferazione e produzione citochinica.

Inoltre, per poter valutare nel dettaglio l'effetto del fumo, è stato anche analizzato lo stato di salute generale dei volontari mediante l'analisi dei principali parametri bio-clinici (esame emocromocitometrico) e mediante la misurazione di proteine sieriche coinvolte nell'infiammazione, attivazione e proliferazione cellulare.

2. INTRODUZIONE

I Maya furono probabilmente il primo popolo a fumare il tabacco utilizzandolo come mezzo di comunicazione con gli dei. Successivamente, nel primo ventennio del XVI secolo, il tabacco fece la sua comparsa in Europa come pianta ornamentale nella corte dell'imperatore Carlo V di Spagna. Nel resto d'Europa si diffuse poco tempo dopo come pianta officinale per le proprietà terapeutiche che le venivano attribuite (Diana G., 1999). Infine nel XIX secolo, l'introduzione sul mercato della sigaretta favorì la diffusione del fumo a livello mondiale.

Oggi l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) indica il fumo di sigaretta come la seconda causa di morte nel mondo e la principale causa di morte evitabile, uccidendo circa 6 milioni di persone ogni anno (OMS 2014) e rappresentando un grave problema socio-economico e sanitario difficile da contrastare e controllare.

La tossicità del fumo sull'uomo cominciò ad essere evidenziata già a fine '800 ma la consapevolezza della sua reale pericolosità venne raggiunta a metà degli anni '50 con la pubblicazione di tre studi epidemiologici che dimostrarono la relazione di causa-effetto tra fumo di sigaretta e insorgenza del cancro al polmone. In particolare Winder e Graham esaminando un gruppo di 684 pazienti malati di tumore al polmone, evidenziarono che la maggior parte di essi (il 96.5%) era fumatore. Analogamente Levin e collaboratori dimostrarono che i fumatori hanno il doppio della probabilità di sviluppare cancro al polmone. Nel terzo studio, condotto dai ricercatori Richard Doll ed A. Bradford Hill, vennero raccolti dati anamnestici relativi a patologie e mortalità di circa 40,000 medici inglesi. Anche in questo caso i risultati evidenziarono una relazione tra fumo di sigaretta e insorgenza di cancro al polmone, nonché un aumento della mortalità nei fumatori accaniti. Questo studio epidemiologico venne proseguito poi da Richard Doll che nel 2004 pubblicò

i risultati riguardanti 50 anni di osservazioni, rivelando una riduzione di 7.5 anni dell'aspettativa di vita dei fumatori rispetto ai non fumatori (Doll *et al.* 2004). Vari studi epidemiologici (Holberg *et al.* 1993, Tashkin *et al.* 1984) hanno inoltre messo in evidenza che il fumo è non solo un fattore di rischio per i fumatori, ma rappresenta un importante inquinante degli ambienti *indoor*, affliggendo negativamente anche coloro che vengono esposti passivamente (Lee *et al.* 2015): l'OMS ritiene che le vittime del fumo passivo siano ogni anno circa 600,000. Fortunatamente in campo legislativo sono stati fatti dei passi avanti a questo riguardo: in Italia l'articolo 51 della legge del 16 gennaio 2003 definisce le misure che servono ad eliminare l'esposizione al fumo passivo nei luoghi di lavoro e nei locali pubblici chiusi, con lo scopo esplicito di tutelare la salute dei non fumatori. La legge ha esteso il divieto di fumo a tutti i locali chiusi, pubblici e privati, quindi anche a studi professionali, uffici privati, bar, ristoranti ed altri esercizi commerciali, stabilendo il principio che non fumare nei locali chiusi è la regola e non l'eccezione.

Il fumo di sigaretta è un concentrato di oltre 5,000 agenti chimici con vari effetti tossici, mutageni e carcinogeni (Talhout *et al.* 2011). Un fumatore inala un ricco aerosol di sostanze le cui dimensioni sono abbastanza piccole da permetterne una facile deposizione a livello degli alveoli polmonari e causare profonde alterazioni sia a livello locale (mucose orale, nasale e vie respiratorie) che sistemico (Rennard 2004; Tollerud *et al.* 1989). A livello delle mucose, ad esempio, attiva le cellule epiteliali inducendo il rilascio di chemochine e molecole proinfiammatorie (Mio *et al.* 1997; Kode *et al.* 2006), mentre a livello sistemico causa leucocitosi e una minore funzionalità cellulare (Holt and Keast, 1977; Sopori *et al.* 1994).

È facile quindi dedurre che l'inalazione di questo ricco aerosol possa causare sia un aumentato rischio di sviluppare diverse patologie a carico degli organi che entrano direttamente in contatto con i costituenti del fumo, come infiammazioni croniche, tumori

delle vie respiratorie e malattie cardio-vascolari, che importanti anomalie del sistema immunitario.

Il sistema immunitario è un complesso network di cellule, tessuti e organi che si occupa della difesa dell'organismo dalla continua esposizione ad agenti “estranei” che potrebbero danneggiarlo. La cute e le mucose, che rappresentano la nostra prima barriera di difesa, sono ad esempio popolate da migliaia di specie batteriche potenzialmente patogene, così come l'aria che respiriamo, per cui il corretto funzionamento di questo sistema di difesa è fondamentale per il mantenimento di un buono stato di salute. Dal punto di vista funzionale l'immunità è organizzata principalmente in due grandi branche interconnesse: l'immunità innata e l'immunità adattativa. Il sistema immunitario innato si occupa di garantire una difesa immediata e aspecifica dell'organismo. Monociti, macrofagi, neutrofili, proteine del complemento e alcune citochine sono i principali attori di questo tipo di risposta immunitaria che, essendo altamente conservata in natura, risulta essere fondamentale per la sopravvivenza. L'immunità adattativa, caratteristica delle specie animali superiori, si attiva invece in seguito ad uno stimolo specifico (antigene) scatenando una risposta immunitaria altamente efficace mediata dai linfociti T e B. Inoltre, la risposta immunitaria adattativa, avendo bisogno di più tempo per svilupparsi (da giorni a settimane), risulterà più lenta ma avrà il vantaggio di poter sviluppare una “memoria” che renderà la risposta immunitaria molto più rapida nel caso di una successiva esposizione allo stesso antigene (Parkin and Cohen, 2001).

L'alterazione di questo delicato equilibrio oltre che causare fenomeni patologici “acuti” potrebbe determinare l'insorgere di fenomeni autoimmuni, malattie infiammatorie croniche o deficit immunitari. I fattori congeniti sono tra le principali cause di alterazione della risposta immunitaria, ma a questi si aggiungono anche fattori ambientali quali infezioni virali o batteriche e lo stile di vita come il fumo e l'alcool.

Tra i componenti del fumo di sigaretta sono presenti cinque noti carcinogeni umani e diversi agenti tossici quali monossido di carbonio, ammoniaca, acroleina, acetone, nicotina, catrame, benzopireni, idrochinone (Jaakkola and Jaakkola 1997) ognuno dei quali è in grado di esercitare molteplici effetti sul sistema immune. Per fare solo alcuni esempi l'acroleina è un'aldeide tossica che altera la funzionalità dei neutrofili e diminuisce la resistenza alle infezioni; il benzo(a)pirene riduce la massa dei tessuti linfoidei e l'idrochinone, metabolita del benzene, sembra inibire la progressione del ciclo cellulare nei linfoblasti T (Rodriguez *et al.* 1999). Inoltre il fumo di sigaretta presenta elevate concentrazioni di radicali liberi, oltre che sostanze in grado di liberarne a loro volta di endogeni, che possono determinare mutazioni nel DNA (Pryor *et al.* 1998; Costenbader and Karlson 2006).

In questo complesso aerosol di sostanze discorso a parte merita la nicotina, alcaloide naturale delle foglie di tabacco (Benowitz *et al.* 2009) con proprietà psicoattive, immunomodulanti e potenzialmente terapeutiche (Piao *et al.* 2009). La nicotina, una volta inspirata con il fumo di sigaretta, raggiunge gli alveoli polmonari dove si trova, in parte, in uno stato non ionizzato che ne facilita il rapido passaggio attraverso le membrane biologiche e quindi l'assorbimento nei tessuti (Gori *et al.* 1986; Pankow 2001). A questo punto è in grado di raggiungere rapidamente il sistema nervoso centrale (10-20 secondi) dove favorisce il rinforzo positivo, pertanto l'assunzione e la dipendenza (Benowitz 1990). A livello epatico, ad opera di due isoforme del citocromo P450 (gli enzimi CYP2A6 e CYP2B6), la nicotina viene convertita in diversi metaboliti ed escreta sotto forma di cotinina con le urine (Benowitz *et al.* 1994).

Le proprietà immunomodulanti della nicotina si manifestano sopprimendo sia la risposta immunitaria innata che adattativa; l'esposizione alla nicotina in effetti diminuisce l'infiammazione (Kalra *et al.* 2004), la proliferazione di cellule mononucleate nel sangue

periferico e influenza la produzione di citochine da parte dei linfociti (Piao *et al.* 2009). Animali trattati cronicamente presentano una riduzione significativa della risposta anticorpale e della proliferazione dei linfociti T (Levin and Simon, 1998). Tale immunosoppressione permane anche diverse settimane dopo il trattamento (Geng *et al.* 1996), probabilmente a causa di una ridotta funzionalità del recettore delle cellule T (*T Cell Receptor* o TCR) che permette alla cellula di entrare nel ciclo cellulare e proliferare (Kalra *et al.* 2000). L'azione della nicotina sul sistema immunitario sembra sia mediata dai recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), presenti in numerosi organi, comprese le cellule del sistema immunitario (Kuo *et al.* 2002; Toyabe *et al.* 1997). I nAChRs sono recettori pentamerici composti da differenti subunità: α , β , γ , δ e ϵ che trasducono il segnale generato dal legame di neurotrasmettitori. Esistono 9 subunità α e 4 subunità β che nelle diverse combinazioni possono avere funzioni fisiologiche e ligandi differenti (de Jonge and Ulloa 2007). Fuji e colleghi (2004) hanno evidenziato che linfociti e macrofagi possiedono un sistema colinergico completo, che include sia l'abilità di sintesi che di degradazione dell'acetilcolina. I linfociti T, sia CD4 che CD8, una volta attivati esprimono i recettori nAChR di tipo $\alpha 4$ e la nicotina è in grado di aumentarne l'espressione sulle cellule del sistema immunitario alterando il rilascio e la produzione di citochine (Skok *et al.* 2007). La nicotina infatti agendo su questi recettori promuove la funzionalità delle cellule T favorendo la risposta immunitaria T helper di tipo 2 (Th2) e la relativa produzione citochinica (interleuchina 4, interleuchina 6 e interleuchina 10) e riducendo parallelamente la risposta Th1- e Th17-mediata (Nizri *et al.* 2009).

Alcuni scienziati hanno mostrato come l'esposizione alla nicotina nel topo sia in grado di ritardare e attenuare l'infiammazione, l'infiltrazione infiammatoria nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) e i sintomi clinici dell'encefalomielite sperimentale autoimmune (EAE- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), malattia infiammatoria del SNC i cui

sintomi e segni clinici nel topo sono paragonabili alla sclerosi multipla nell'uomo (Shi *et al.* 2009; Gao *et al.* 2014) proprio agendo sui recettori nAChR. Questi dati sembrerebbero in contrapposizione a diversi studi epidemiologici che hanno evidenziato una correlazione tra fumo di sigaretta e aumentato rischio d'insorgenza di malattie neurologiche come la sclerosi multipla (Friend *et al.* 2006; Johnson *et al.* 2005, Hawakes *et al.* 2007). Tuttavia le proprietà immunomodulanti della sola nicotina non possono essere paragonate all'effetto complessivo dell'aerosol di sostanze di cui il fumo di sigaretta è composto, che potrebbero esercitare molti più effetti deleteri predisponenti per la malattia rispetto alla sola azione “protettiva” della nicotina.

A livello fisio-patologico, il primo distretto dell'organismo che viene direttamente a contatto con il fumo di sigaretta e con i suoi componenti sono le vie respiratorie. In particolare i polmoni essendo uno degli organi maggiormente esposti ai patogeni presenti nell'aria che respiriamo possiedono adeguate linee di difesa, la principale rappresentata da un epitelio mucoso dotato di cilia vibratili capaci di intrappolare e rimuovere gli agenti estranei (Reynolds *et al.* 1987). A questo livello il fumo di sigaretta esercita un effetto citotossico e irritante, compromettendo l'integrità delle giunzioni serrate, con un conseguente aumento della permeabilità dell'epitelio respiratorio, riducendo la motilità delle cilia, aumentando la secrezione di muco e causando mutazioni somatiche nelle cellule epiteliali (Mehta *et al.* 2008; Maunders *et al.* 2007).

A livello polmonare e a livello delle vie respiratorie sono presenti cellule sia dell'immunità innata che adattativa, ma i principali protagonisti in questo distretto sono i macrofagi alveolari e i monociti. Sembra che il fumo di sigaretta determini un aumento di queste cellule attivandole a produrre molecole proinfiammatorie, specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed enzimi proteolitici favorendo il danno tissutale. Il fumo di sigaretta inoltre compromette l'abilità dei macrofagi alveolari di fagocitare batteri e cellule apoptotiche (de

Boer *et al.* 2000; Russel *et al.* 2002) mediante l'inattivazione di importanti *pathway* cellulari e l'alterazione di vie enzimatiche che portano alla disregolazione di fattori di trascrizione come il *Nuclear Factor kappa B* (NFkB) coinvolto nell'espressione di proteine proinfiammatorie (Mian *et al.* 2009; Lawrence 2009). Al di sotto dell'epitelio mucoso polmonare sono poi localizzate altre cellule dell'immunità innata che si occupano di processare e presentare gli antigeni ai linfociti: le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*-DC) (Mellman *et al.* 2001). Nelle vie respiratorie dei fumatori le DC mostrano una maggiore espressione delle molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 e una riduzione di molecole che regolano l'*homing* cellulare quali il recettore CCR7. Sembrerebbe quindi che le DC dei fumatori siano maggiormente abili nell'attivare la risposta delle cellule T ma meno capaci di migrare verso i linfonodi drenanti portando ad un blocco del loro processo di maturazione (Arnson *et al.* 2010; Vassallo *et al.* 2005).

Il fatto che il fumo di sigaretta sia uno dei principali fattori di rischio nell'insorgenza di diversi tipi di tumore, ha portato diversi gruppi di ricerca a studiare gli effetti del fumo sulle cellule Natural Killer (NK) che si occupano della sorveglianza antitumorale. Alcuni studi riportano una riduzione della loro attività antitumorale nei fumatori (Mian *et al.* 2009), dato confermato anche su modelli animali (Ferson *et al.* 1979, Mian *et al.* 2008).

Queste considerazioni sembrano quindi a supporto del contributo del sistema immune nel causare un aumentato rischio di sviluppare tumori nei fumatori, tuttavia la maggior parte dei tumori più frequenti sono spesso localizzati negli organi che vengono direttamente esposti alle sostanze cancerogene e tossiche in esso contenute (bocca, faringe, polmoni ecc) o ai loro metaboliti (vescica) (Ng *et al.* 2009, Kuper *et al.* 2002), per cui il ruolo svolto dalle cellule del sistema immunitario in questo contesto potrebbe essere marginale.

A livello sistemico il principale effetto del fumo di sigaretta è la leucocitosi, tuttavia le osservazioni sulle varie sottopopolazioni leucocitarie sono spesso contrastanti, per esempio

alcuni autori riportano nei fumatori una riduzione di cellule CD4+ (cellule T helper), un aumento di cellule T CD8+ (citotossiche) ed una conseguente riduzione del rapporto CD4+/CD8+ (Robbins *et al.* 2008). Altri autori evidenziano invece un aumento di linfociti T CD4+, ed un aumento significativo del rapporto CD4+/CD8+ e non trovano differenze significative nei livelli di cellule B e di monociti (Tollerud *et al.* 1989).

Le alterazioni immunitarie appena descritte suggeriscono che il fumo di sigaretta possa contribuire all'insorgenza di alcune patologie a carico del sistema immunitario fra cui le autoimmuni. La maggior parte delle malattie autoimmuni sono definite multifattoriali o complesse in quanto determinate dall'interazione di numerosi geni con l'ambiente. Il fatto stesso che il tasso di concordanza per autoimmunità in gemelli monozigoti sia ben al di sotto del 100% evidenzia come la predisposizione per patologie venga pesantemente influenzata dall'ambiente. Il fumo di sigaretta, così come l'esposizione ad agenti infettivi, la somministrazione di vaccini o di farmaci e lo stress sono solo alcuni dei fattori ambientali associati ad autoimmunità (Shoenfeld *et al.* 2008).

Il fumo di sigaretta è considerato un fattore di rischio per artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico (LES), sclerosi multipla, ipertiroidismo di Graves, cirrosi biliare primaria (Hutchinson *et al.* 2001; Costenbader and Karlson 2006; Parikh *et al.* 2001; Hernan *et al.* 2005), mentre risulta essere protettivo per colite ulcerosa, sarcoidosi, endometriosi, malattia di Parkinson, sindrome di Sjorgren (Sopori *et al.* 1994), tuttavia i meccanismi specifici attraverso i quali il fumo di sigaretta esercita effetti di predisposizione per alcune patologie e protezione per altre non sono chiari. Una delle maggiori difficoltà che si riscontrano nell'indagine scientifica è sicuramente data dai numerosi agenti tossici che compongono il fumo di sigaretta. Diversi studi hanno comunque cercato di spiegare i meccanismi che possono far luce sul suo ruolo nello sviluppo e nella severità di fenomeni autoimmuni proponendo diversi meccanismi. Alcuni

autori ritengono infatti che il fumo di sigaretta favorisca sia l'apoptosi, inducendo l'espressione sulla superficie cellulare di linfociti B e T di recettori coinvolti nell'attivazione dei *pathway* di morte programmata quali il CD95, appartenente alla superfamiglia dei recettori *Tumor Necrosis Factor* (TNF), sia la necrosi cellulare in seguito a ipossia tissutale o indotta da tossine con conseguente liberazione di antigeni intracellulari. L'aumento di materiale intracellulare determinerebbe un sovraccarico nelle funzioni di "pulizia" del sistema immunitario che, in individui suscettibili, potrebbe scatenare una risposta immunitaria incontrollata (Arnson *et al.* 2010; Bijl *et al.* 2001). Ci sono inoltre evidenze che il fumo determini un aumento delle cellule B auto-reattive (Grimaldi *et al.* 2002, Klaresgog *et al.* 2006) ed un aumento di autoanticorpi, in particolare del fattore reumatoide anti nucleare.

Queste considerazioni mettono in luce che, a causa della sua composizione così eterogenea, gli effetti del fumo di sigaretta sull'organismo umano sono molteplici e spesso di natura contrastante, rendendo difficoltosa l'indagine scientifica. A questa considerazione si aggiunge un ulteriore grado di complessità dato dall'interazione di questo aerosol eterogeneo di sostanze tossiche con le caratteristiche genetiche, immunologiche e ambientali individuali.

3. DISEGNO SPERIMENTALE

Nel presente studio è stato analizzato l'effetto del fumo di sigaretta sul generale stato di salute di 1,600 volontari ProgeNIA (20% fumatori, 17% ex-fumatori e 63% non fumatori), in particolare focalizzando l'attenzione sul sistema immunitario. A questo scopo è stato caratterizzato il profilo immunologico misurando i livelli di 95 popolazioni cellulari circolanti nel sangue periferico, appartenenti sia all'immunità innata che adattativa (Tabella 2), mediante citofluorimetria policromatica. Questo approccio ha permesso l'identificazione della popolazioni leucocitaria che, fra quelle analizzate, veniva maggiormente alterata dal fumo di sigaretta: le cellule T regolatorie. Sono state testate quindi la capacità proliferativa e secretoria di queste cellule per capire se il fumo determini anche alterazioni di tipo qualitativo, ossia disregolazioni della funzionalità cellulare, oltre che di tipo quantitativo.

A completamento e integrazione del quadro immunologico è stato valutato l'effetto del fumo di sigaretta sul profilo infiammatorio dei volontari misurando i livelli sierici di marcatori di infiammazione vascolare quali, interleuchina-6 (IL6), Monocyte-Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) e Proteina C Reattiva (PCR), proteine sieriche di cui è noto un coinvolgimento nel rischio cardiovascolare (McCarty *et al.* 1999; Volpato *et al.* 2001; Bermudez *et al.* 2002) e delle immunoglobuline di tipo A, G, M ed E. Sono stati misurati inoltre i livelli sierici del marcatore di proliferazione cellulare *B cell activating factor* (sBAFF), che promuove la sopravvivenza e il differenziamento dei linfociti B, e della catena alfa del recettore dell'interleuchina 2, detta CD25 solubile (sCD25), che viene anche espressa sulla membrana plasmatica di diversi tipi di cellule immunitarie, tra cui i linfociti T, dove rappresenta un marcatore di attivazione cellulare. Infine è stato valutato

l'effetto del fumo sui principali parametri bio-clinici misurati mediante il test emocromocitometrico.

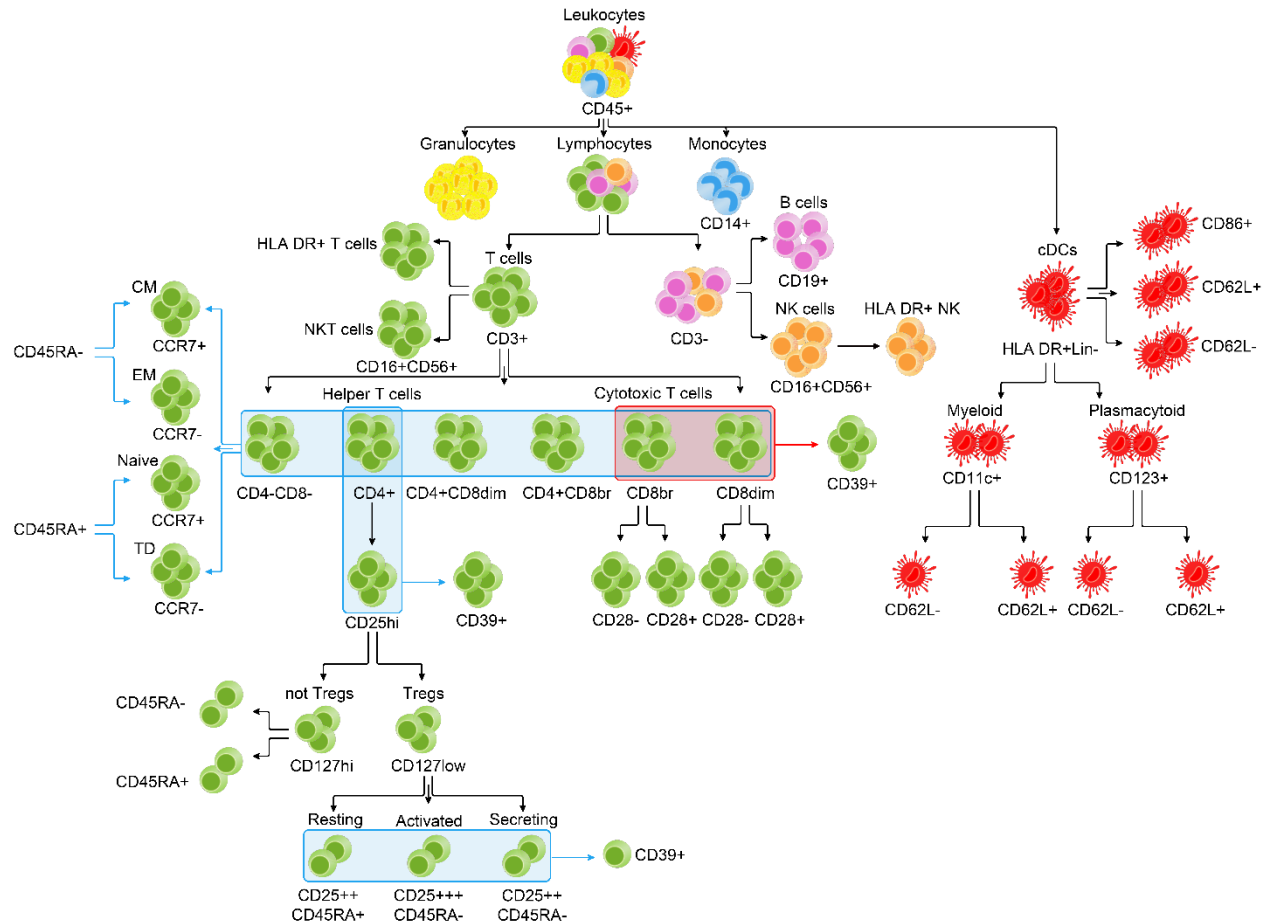


Figura 1. Popolazioni leucocitarie oggetto dello studio (Orrù *et al.* 2013).

4. MATERIALI E METODI

4.1 POPOLAZIONE OGGETTO DELLO STUDIO: IL PROGETTO PROGENIA/SARDINIA

Lo studio ProgeNIA nasce nel 2001 grazie alla collaborazione dell'odierno Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche e il National Institute on Aging statunitense con lo scopo di studiare longitudinalmente numerosi parametri d'interesse biomedico potenzialmente implicati nei processi di invecchiamento, individuare, attraverso la caratterizzazione genetica dei volontari, varianti del DNA che regolano i livelli quantitativi dei tratti esaminati, e identificare associazioni coincidenti fra i tratti quantitativi oggetto di studio e patologie complesse.

La coorte ProgeNIA è costituita da circa 7,000 individui, di età compresa tra 18 e 102 anni, di chiara origine sarda e provenienti da 4 paesi dell'Ogliastra: Lanusei, Ilbono, Elini ed Arzana (Pilia *et al.* 2006).

Milleseicento volontari appartenenti alla coorte ProgeNIA sono stati classificati in fumatori (20%), non fumatori (63%) ed ex-fumatori (17%) e studiati nel presente progetto.

4.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO IMMUNOLOGICO

La caratterizzazione immunofenotipica dei 1,600 volontari è stata eseguita mediante citometria a flusso (Orrù *et al.* 2013).

La citofluorimetria policromatica è una metodica di ultima generazione in grado di misurare simultaneamente molteplici parametri fisici di particelle, solitamente di natura biologica, come le cellule. Le particelle in sospensione vengono convogliate attraverso un flusso laminare in un punto in cui verranno attraversate da un fascio di luce che determinerà la generazione di segnali a loro volta raccolti e trasformati in segnali elettrici.

Questa metodica permette l'analisi multiparametrica di numerosissime popolazioni cellulari mediante l'utilizzo di anticorpi coniugati con sostanze fluorescenti che riconoscono i loro antigeni specifici sulla superficie delle cellule o al loro interno. In questo modo è possibile determinare il numero di cellule che esprimono la molecola a cui l'anticorpo fluorescente si lega e la sua intensità di espressione ottenendo un profilo dettagliato delle popolazioni cellulari oggetto di studio.

I campioni di sangue periferico prelevati da ciascun volontario sono stati raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante, processati e colorati con anticorpi fluorescenti specifici ed acquisiti mediante l'analizzatore FACSCanto II (BD Biosciences). Per evitare artefatti causati da variabili tempo-dipendenti, la fenotipizzazione leucocitaria dei campioni di sangue fresco è stata effettuata entro due ore dalla loro raccolta.

La caratterizzazione immunologica dei volontari ProgeNIA è stata effettuata mediante 4 pannelli citofluorimetrici (Tabella 1) nominati:

- Cellule T, B e Natural Killer (TBNK)
- Cellule Dendritiche circolanti (cDC)
- Cellule T regolatorie (Treg)
- Stadi di Maturazione dei linfociti T (SMT)

1) Pannello TBNK. Questo pannello è stato disegnato per analizzare dettagliatamente le sottoclassi di leucociti (CD45+) focalizzandosi in particolare sui linfociti e dividendoli in base all'espressione dell'antigene CD3. I linfociti CD3 negativi sono stati ulteriormente suddivisi in cellule B (CD3-CD19+) e in cellule Natural Killer (CD16+ o CD56+), mentre i linfociti CD3 positivi, o cellule T, sono stati suddivisi in sei sottogruppi in base alla differente espressione degli antigeni CD4 e CD8.

Mediante l'antigene HLA-DR, espresso in maniera costitutiva sulle cellule presentanti l'antigene, è stato valutato il grado di attivazione delle cellule T ed NK. In questo stesso

pannello sono stati analizzati inoltre i monociti CD14⁺ e i granulociti (Figura 2 Dot Plot A-G).

Infine, per stimare la conta assoluta di ogni singola popolazione cellulare è stato utilizzato un protocollo *Lyse-No-Wash* (descritto sotto) e tubi BD TruCount™ (cat. 340334) al cui interno sono presenti le biglie necessarie per calcolare la conta assoluta espressa come numero di cellule/μl.

2) Pannello Treg. Abbiamo identificato le CD4⁺ Treg in base all'elevata espressione sulla superficie cellulare dell'antigene CD25 e la ridotta espressione dell'antigene CD127 (CD25^{hi}, CD127^{low}). Le cellule Treg sono state suddivise in base all'espressione del CD45RA in attivate (CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻), a riposo (CD25⁺⁺CD45RA⁺) e secrete non soppressive (CD25⁺⁺CD45RA⁻). Abbiamo inoltre analizzato le cellule T helper (CD4⁺) esprimenti alti livelli dell'antigene CD25^{high} ma non appartenenti alle cellule T regolatorie (CD25^{hi} CD4⁺ non Treg) e dividendole in base all'espressione dell'antigene CD45RA.

In questo stesso pannello abbiamo inoltre valutato l'espressione degli antigeni CD28 e CD45RA nelle cellule T CD8⁺. In alcune sottopopolazione linfocitarie, abbiamo infine valutato il numero di cellule positive per l'antigene CD39 (Figura 2 Dot Plot H-R).

3) Pannello SMT. In base all'espressione degli antigeni CD45RA e CCR7 (Sallusto *et al.* 1999) ognuna delle sottopopolazioni di cellule T descritte nel pannello TBNK è stata così suddivisa: Naïve (CD45RA⁺ CCR7⁺) linfociti maturi che non hanno ancora incontrato l'antigene, *Central Memory* (CCR7⁺ CD45RA⁻), cellule di memoria che hanno bisogno di incontrare nuovamente l'antigene prima di diventare effettrici, *Effector Memory* (CD45RA⁻ CCR7⁻), cellule di memoria pronte ad esercitare la loro funzione effettrice nel sito di infiammazione, e *Terminally Differentiated* (CCR7⁻ CD45RA⁺) destinate ad andare

incontro ad apoptosi in quanto è trascorso troppo tempo dall'ultima stimolazione antigenica (Figura 2 Dot Plot S-U).

4) Pannello cDC. Abbiamo identificato le cDC in base alla forte espressione del marcatore di attivazione cellulare HLA-DR e alla negatività per una serie di antigeni organizzati in un cocktail detto *Lineage* (Lin) costituito dagli anticorpi rivolti contro gli antigeni di superficie CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56. Le cDC sono state suddivise in mieloidi e plasmacitoidi in base alla positività rispettivamente per l'antigene CD11c e CD123. È stato inoltre valutato il loro stato di maturazione in base ai livelli di espressione della molecola di adesione CD62L, del recettore chemochinico CCR2 e delle molecole co-stimolatorie CD86 e CD80 (Figura 2 Dot Plot V-Y).

Per i pannelli descritti ai punti 2, 3 e 4 la colorazione è stata eseguita utilizzando un protocollo Lyse-Wash (descritto sotto) e tubi BD Lyotube in cui il cocktail di anticorpi pretitolati era già presente nel tubo in forma liofilizzata. Per i pannelli 2 e 3 le conte assolute sono state calcolate utilizzando le conte assolute dei linfociti CD3+ valutate nel pannello delle TBNK, mentre nel pannello dedicato alle cDC sono state aggiunte 50 µl di biglie di conta (Liquid BD Counting Beads, BD cat. 335925) al campione.

Utilizzando i quattro pannelli citofluorimetrici descritti sopra, sono stati analizzati 272 tratti immunofenotipici che comprendono 95 conte assolute (esprese in numero di cellule/µl) (Figura 1 e Tabella 2), 174 percentuali rispetto alla popolazione cellulare gerarchicamente superiore sia di una generazione (popolazione parentale) che di due generazioni (popolazione granparentale). Ad esempio la popolazione cellulare dei linfociti T helper è stata considerata come percentuale rispetto ai linfociti T (popolazione parentale) e rispetto ai linfociti totali (popolazione granparentale). Abbiamo infine considerato 3 rapporti cellulari ampiamente utilizzati in campo clinico, come cellule T/cellule B o cellule T helper/cellule T citotossiche.

4.2.1 PROTOCOLLO LYSE NO WASH

Le biglie di conta presenti nel tubo BD TruCount™ sono state risospese in 50 µl di sangue periferico fresco e il campione è stato marcato con la mix di anticorpi descritta per il pannello TBNK (Tabella 1). Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio, le cellule sono state risospese in 1 mL di *FACS LYSING Solution 1x* (BD, cat. 349202) e analizzate al citometro a flusso.

4.2.2 PROTOCOLLO LYSE-WASH

La mix di anticorpi liofilizzati pre-titolati (descritta nella Tabella 1 per i pannelli Treg, SMT e cDC) è stata risospesa in 100 µl di soluzione di lavaggio (*FACS FLOW*, BD cat. 342003), sono stati quindi aggiunti 100 µl di sangue intero. Segue un'incubazione al buio per 15 minuti per permettere la marcatura delle cellule e la lisi dei globuli rossi con 3 mL di *FACS LYSING Solution 1x*. Dopo 30 minuti di incubazione i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 400g. Il *pellet* cellulare è stato quindi risospeso in 500 µl di soluzione di lavaggio e analizzato al citofluorimetro FACS CANTO II.

4.2.3 SETTAGGIO STRUMENTALE DEI CITOFLUORIMETRICI

I campioni sono stati acquisiti mediante due citofluorimetri BD FACSCanto™ II a 3 laser (blu, emissione 488 nm; rosso, emissione 633 nm; viola, emissione 407 nm), che permettono la rilevazione di 8 fluorescenze e due parametri fisici, e sono stati analizzati mediante il software BD FACSDiva™. Per massimizzare la sensibilità di risoluzione della fluorescenza tra i due strumenti è stato utilizzato un unico settaggio strumentale. In dettaglio, è stata valutata la deviazione standard del rumore di fondo elettronico (*Standard Deviation of Electronic background Noise*, SDEN) di tutti i parametri di fluorescenza nei

due strumenti tramite le biglie *Cytometer Setup and Tracking* (CS&T, BD, cat. 642412) e mediante uno specifico software “BD FACSDiva CS&T Module”. Considerando i valori più alti per ogni parametro, è stata generata una matrice della SDEN. Questa è stata usata come riferimento per settare entrambi i citofluorimetri in modo che la varianza del segnale di fondo ($SDEN^2$) influenzasse la varianza totale del campione di linfociti non colorati in una percentuale compresa tra il 10% e il 20% del totale.

Il settaggio dei fotomoltiplicatori è stato attuato in uno strumento mediante la creazione di valori di riferimento che costituiscono la “*baseline*” e che sono stati applicati inizialmente alle cellule e successivamente alle biglie CS&T. Questi valori sono stati trasferiti indirettamente sul secondo strumento mediante le biglie CS&T stesse che hanno permesso di generare un settaggio strumentale identico nei due analizzatori. Tutti i segnali rientravano nel range di linearità degli strumenti per i parametri misurati. La compensazione, ovvero il processo che permette di correggere il fenomeno per cui un fluorocromo viene letto da un fotomoltiplicatore non deputato alla lettura di quello specifico fluorocromo (*spillover*), è stata calcolata usando le BD CompBeads (BD, cat. 552843) e perfezionata manualmente.

4.2.4 RIPRODUCIBILITÀ DELLE MISURAZIONI

La riproducibilità dei fenotipi è stata costantemente monitorata utilizzando 4 controlli:

- a) Il sistema CS&T che consiste in un controllo elettronico automatico giornaliero che permette di mantenere costanti nel tempo le performance del citofluorimetro attraverso la modificazione dei parametri interni dell’analizzatore.
- b) Le biglie fluorescenti Rainbow a 8 picchi, (SpheroTM, cat. 559123) che hanno una fluorescenza standardizzata al fine di controllare e sostenere nel tempo le stesse condizioni

di acquisizione e, in caso di necessità, normalizzare le intensità di fluorescenza media ottenute nei campioni.

c) Il campione di controllo BD Multicheck™ Quality Control (BD, cat. 340911), costituito da un campione di sangue stabilizzato di cui la ditta produttrice fornisce i valori del saggio e i range delle misurazioni attese relative alle principali classi linfocitarie.

d) Per stimare in maniera specifica la riproducibilità delle misurazioni, abbiamo inoltre paragonato i valori ottenuti da 13 partecipanti richiamati almeno tre mesi dopo il primo prelievo e rianalizzati nelle stesse condizioni ottenendo una buona riproducibilità in tutte le categorie cellulari analizzate. La categoria cellulare più riproducibile è risultata essere quella dei leucociti totali (coefficiente di correlazione=0.94, media=0.84, deviazione standard=0.53), mentre quella relativa alle DC circolanti è risultata essere la meno riproducibile (mediana=0.79, media=0.56, deviazione standard=0.53) coerentemente al loro ruolo primario nella risposta immediata alle infezioni. Gli stadi di maturazione dei linfociti T e le Treg hanno invece lo stesso grado di riproducibilità (mediana=0.87 e 0.89, media=0.78 e 0.75, deviazione standard=0.21 e 0.27, rispettivamente).

Pannello	Anticorpo	Fluorocromo	Clone
T-B-NK	α -CD45	PerCP-Cy5.5	2D1 (HLe-1)
	α -CD14	V450	M ϕ P9
	α -CD3	FITC	SK7
	α -CD4	PE-Cy7	SK3
	α -CD8	APC-Cy7	SK1
	α -CD19	APC	SJ25C1
	α -CD16+CD56	PE	B73.1+NCAM16.2
	α -HLA DR	V500	G46-6
Treg	α -CD3	FITC	SK7
	α -CD4	APC-H7	SK3
	α -CD8	V500	RPA-T8
	α -CD25	PE-Cy7	2A3
	α -CD45RA	V450	HI100
	α -CD39	APC	TU66
	α -CD28	PE	L293
	α -CD127	PerCP-Cy5.5	hIL-7R-M21
SMT	α -CD3	FITC	SK7
	α -CD4	APC	SK3
	α -CD8	APC-H7	SK1
	α -CD45RA	V450	HI100
	α -CCR7	PerCP-Cy5.5	150503
cDC	Lin cocktail (α -CD3+ α -CD14+ α -CD16+ α -CD19+ α -CD20+ α -CD56)	PE	SK7+M5E2+B73.1+SJ25C1+L27+NCAM16.2
	α -HLA DR	V500	G46-6
	α -CD123	PE-Cy7	7G3
	α -CD11c	V450	B-Ly6
	α -CD86	PerCP-Cy5.5	FUN-1
	α -CD80	APC-H7	L307.4
	α -CD62L	FITC	SK11
	α -CCR2	Alexa Fluor 647	48607

Tabella 1. Elenco degli anticorpi, e relativi fluorocromi e cloni, utilizzati per identificare le sottopopolazioni leucocitarie nei 4 pannelli citofluorimetrici.

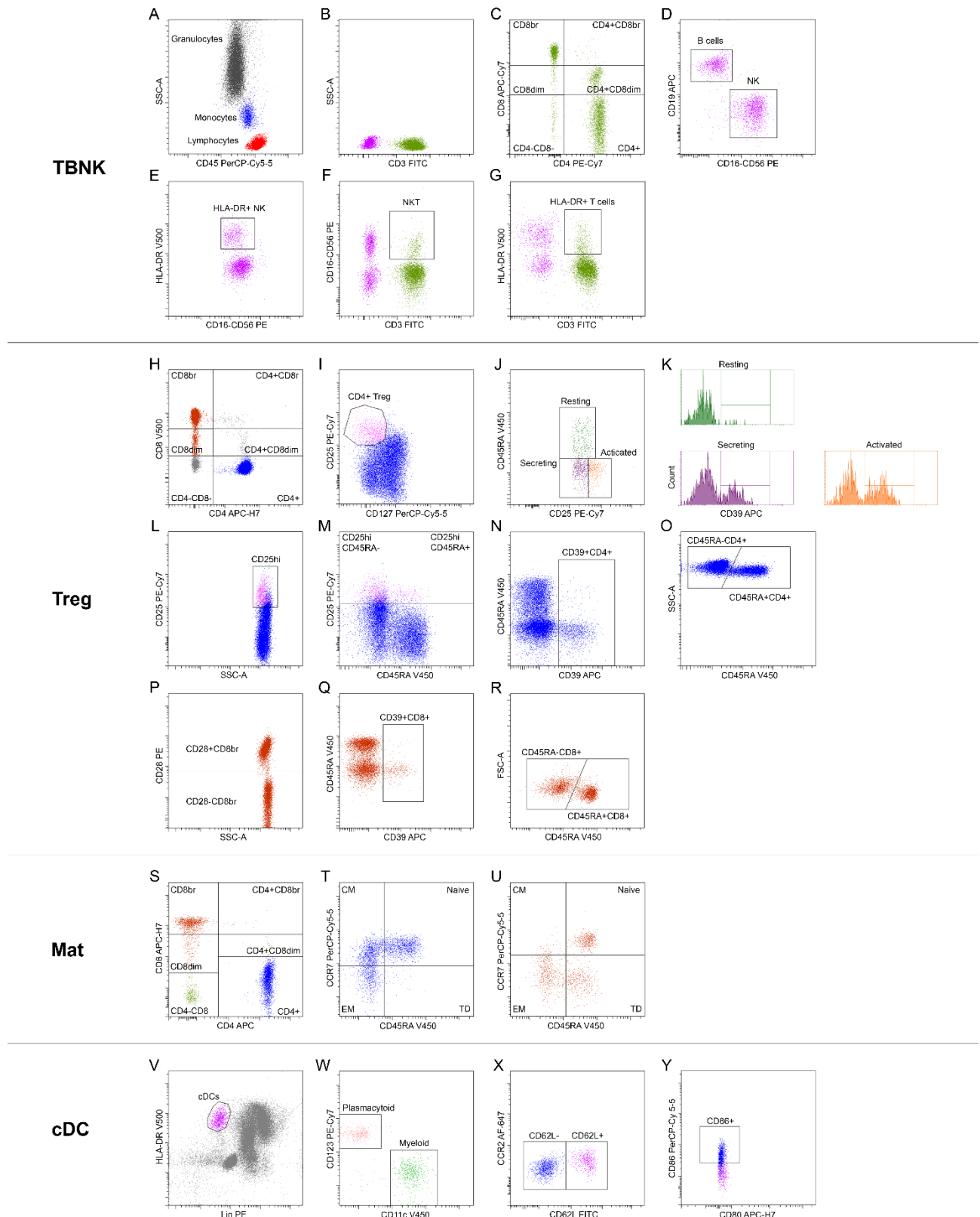


Figura 2. Strategia di gating utilizzata per l'identificazione delle sottopopolazioni leucocitarie (Orrù *et al.* 2013).

PANNELLO	TRATTO	POPOLAZIONE PARENTALE	POPOLAZIONE GRANPARENTALE
TREG	CD25hi CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD39+ CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD39+ CD25hi CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD28- CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
TREG	CD28+ CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
TREG	CD28- CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
TREG	CD28+ CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
TREG	CD28- CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
TREG	CD39+ CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
TREG	CD4+ Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	resting CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD39+ resting CD4+ Treg AC	resting CD4+ Tregs	CD4+ Tregs
TREG	activated CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD39+ activated CD4+ Treg AC	activated CD4+ Tregs	CD4+ Tregs
TREG	secreting CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD39+ secreting CD4+ Treg AC	secreting CD4+ Tregs	CD4+ Tregs
TREG	CD39+ CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	secreting & activated CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD39+ (secreting & activated) CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	resting & activated CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD39+ (resting & activated) CD4+ Treg AC	CD4+ Tregs	CD4+
TREG	CD4+ not Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD45RA- CD4+ not Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD45RA+ CD4+ not Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD45RA- CD25hi CD4+ not Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD45RA+ CD25hi CD4+ not Treg AC	CD4+	T lymphocytes
TREG	CD45RA- CD28- CD8br AC	CD28- CD8br	CD8br
TREG	CD45RA+ CD28- CD8br AC	CD28- CD8br	CD8br
TREG	CD45RA- CD28- CD8dim AC	CD8dim	
TREG	CD45RA+ CD28- CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
TREG	CD45RA- CD28- CD8+ AC	CD28- CD8+	CD8+
TREG	CD45RA- CD28+ CD8+ AC	CD45RA- CD8+	CD8+
TREG	CD45RA+ CD28- CD8+ AC	CD28- CD8+	CD8+
TREG	CD45RA+ CD28+ CD8+ AC	CD45RA+ CD8+	CD8+
TBNK	Granulocyte AC	Leukocytes	no
TBNK	Monocyte AC	Leukocytes	no
TBNK	Lymphocyte AC	Leukocytes	no
TBNK	T lymphocyte AC	Lymphocytes	Leukocytes
TBNK	CD4+ AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD8br AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD8dim AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD8+ AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD4+ CD8br AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD4+ CD8dim AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD4+ CD8+ AC	T lymphocytes	Lymphocytes

TBNK	CD4- CD8- AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	HLA DR+ T lymphocyte AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	NKT AC	T lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	CD3- lymphocyte AC	Lymphocytes	Leukocytes
TBNK	B cell AC	CD3- lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	NK AC	CD3- lymphocytes	Lymphocytes
TBNK	HLA DR+ NK AC	NK cells	CD3- lymphocytes
TBNK	Lymphosum AC	Lymphocytes	Leukocytes
TBNK	CD4+/CD8br	no	no
TBNK	CD4+/CD8+	no	no
TBNK	T/B cells	no	no
SMT	naïve CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	CM CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	EM CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	TD CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	CD45RA- CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	CD45RA+ CD4+ AC	CD4+	T lymphocytes
SMT	naïve CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
SMT	CM CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
SMT	EM CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
SMT	TD CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
SMT	CD45RA- CD8br AC	CD8br	T lymphocytes
SMT	naïve CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
SMT	CM CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
SMT	EM CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
SMT	TD CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
SMT	CD45RA- CD8dim AC	CD8dim	T lymphocytes
SMT	naïve CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	CM CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	EM CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	TD CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	CD45RA- CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	CD45RA+ CD8+ AC	CD8+	T lymphocytes
SMT	naïve (CD4+ CD8+) AC	CD4+ CD8+	T lymphocytes
SMT	CM (CD4+ CD8+) AC	CD4+ CD8+	T lymphocytes
SMT	EM (CD4+ CD8+) AC	CD4+ CD8+	T lymphocytes
SMT	TD (CD4+ CD8+) AC	CD4+ CD8+	T lymphocytes
SMT	CD45RA- (CD4+ CD8+) AC	CD4+ CD8+	T lymphocytes
SMT	naïve (CD4- CD8-) AC	CD4- CD8-	T lymphocytes
SMT	CM (CD4- CD8-) AC	CD4- CD8-	T lymphocytes
SMT	EM (CD4- CD8-) AC	CD4- CD8-	T lymphocytes
SMT	TD (CD4- CD8-) AC	CD4- CD8-	T lymphocytes
SMT	CD45RA- (CD4- CD8-) AC	CD4- CD8-	T lymphocytes
cDC	cDC AC	no	no
cDC	CD62L- cDC AC	cDCs	no
cDC	CD62L+ cDC AC	cDCs	no

cDC	myeloid cDC AC	cDCs	no
cDC	CD62L- myeloid cDC AC	cDCs	no
cDC	CD62L+ myeloid cDC AC	cDCs	no
cDC	plasmacytoid cDC AC	cDCs	no
cDC	CD62L- plasmacytoid cDC AC	cDCs	no
cDC	CD62L+ plasmacytoid cDC AC	cDCs	no
cDC	CD86+ cDC AC	cDCs	no

Tabella 2. Elenco dei tratti immunofenotipici analizzati. Da destra verso sinistra sono indicati il pannello citofluorimetrico utilizzato per la misurazione, il nome del tratto, la relativa popolazione cellulare parentale e granparentale.

4.3 TEST FUNZIONALI

4.3.1 RACCOLTA E CRIOCONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La funzionalità delle cellule Treg è stata valutata confrontando 12 fumatori vs 12 non fumatori di età compresa fra 35 e 55 anni.

I 12 fumatori dovevano necessariamente fumare almeno 20 sigarette al dì da almeno 10 anni (fumatori accaniti), mentre i 12 non fumatori non dovevano aver mai fumato nella loro vita. Ogni giorno sono stati reclutati due individui, un fumatore e un non fumatore dello stesso sesso e di pari età anagrafica. I volontari sono stati quindi sottoposti ad un prelievo di 7 ml di sangue raccolto in un tubo contenente eparina da cui sono state isolate le cellule mononucleate mediante separazione su gradiente e in condizioni di sterilità. Brevemente, il sangue fresco è stato diluito 1:1 con soluzione tampone Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS Sigma, cat. BE1054-3F) e la miscela è stata trasferita in un tubo contenente Hystopaque (Sigma, cat. 10771) in rapporto 1:1 con il sangue intero. Il campione è stato quindi centrifugato a 350g per 30 minuti a temperatura ambiente. L'anello di linfo-monociti (PBMC-*Peripheral blood mononuclear cell*) è stato quindi prelevato e lavato due volte con soluzione salina PBS 1X (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma cat. D8537) a 250g per 5 minuti.

Per far in modo che i test funzionali avvenissero nelle medesime condizioni sperimentali, i PBMC isolati dal sangue periferico sono stati crioconservati: i PBMC sono stati risospesi in terreno di coltura RPMI 1640 (Lonza, cat. BE12-167F) contenente 10% di FBS (*Fetal bovine serum*) inattivato, L-Glutamina 2mM (Lonza, cat.BE-17-605) e Sodio piruvato 1mM (Sigma, cat. BE-13-115E) (da ora indicato per semplicità come RPMI completo) ad una concentrazione di $1 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^7$ cellule/mL. È stato quindi aggiunto un uguale volume di FBS contenente il 20% di Dimetilsofossido (DMSO Sigma, cat. D2650) a 4°C. La miscela è stata quindi aliquotata in cryovials precedentemente raffreddate e stoccate in un cryocontenitore contenente isopropanolo, che consente il raffreddamento graduale (1°C/min) e costante del campione fino al raggiungimento della temperatura di -80°C. I 24 campioni linfo-monocitari sono stati quindi scongelati sei alla volta, 3 fumatori e 3 non fumatori, seguendo l'accoppiamento in base a età e sesso utilizzato per il reclutamento. Abbiamo in questo modo eseguito un totale di 4 esperimenti riducendo al minimo la variabilità che avrebbe potuto influenzare l'esito del test.

4.3.2 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE

I PBMC sono stati lavati con 4 mL di PBS 1X centrifugando a 400g per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato mediante aspirazione con pompa a vuoto. Il pellet è stato quindi risospeso in PBS 1X, colorato con BD Horizon™ Violet Proliferation Dye 450 (VPD450 BD, cat. 562158), alla concentrazione finale di 1µg/mL e incubato a 37°C in bagnetto termostato per 15 minuti. Il VPD450 è un colorante che permette di visualizzare mediante citofluorimetria il numero di volte in cui la cellula si divide. In breve il VPD450, in forma non fluorescente, attraversa passivamente la membrana cellulare e lega, in seguito all'azione delle esterasi intracellulari di cellule vitali, i gruppi amminici delle proteine. A questo punto il colorante diventa altamente fluorescente distribuendosi uniformemente

nelle cellule figlie ogni volta che la cellula si divide. Le cellule figlie mostreranno ad ogni divisione circa la metà dell'intensità di fluorescenza del colorante mostrata dalle cellule progenitrici.

La sospensione cellulare è stata quindi lavata con 4,5 mL di RPMI completo, centrifugata a 400g per 5 minuti e il surnatante è stato quindi eliminato per aspirazione mediante pompa a vuoto.

Per ogni individuo, sono state stimulate 2×10^6 cellule/mL di RPMI completo per 72 ore a 37°C in piastre da 96 pozzetti con 5 µg/ml di α CD3 (clone OKT3) (eBioscience, cat. 16-0037), fissato al pozzetto della piastra *overnight*, e 1 µg/mL di α CD28 (clone CD28.2) solubile (eBioscience, cat. 16-0289). La stessa quantità di cellule è stata incubata, senza stimolazione, nelle stesse condizioni sperimentali come controllo.

Il surnatante è stato prelevato e crioconservato a -80°C, mentre le cellule sono state lavate con 3 mL di PBS 1X e centrifugate a 400g a temperatura ambiente per 5 minuti. Le cellule sono state marcate per 30 minuti al buio con gli anticorpi extracellulari specifici per l'identificazione delle Treg (Tabella 3), lavate con 3 ml di PBS 1X e centrifugate a 400g a temperatura ambiente per 5 minuti. Le cellule sono state quindi fissate, permeabilizzate con il Kit Intrasure (BD cat. 641778), seguendo le istruzioni della ditta produttrice, e colorate intracellularmente per 30 minuti al buio con gli anticorpi che riconoscono le citochine IL10 e IL17-A (Tabella 3). Infine le cellule sono state lavate con 2 mL di PBS 1X, centrifugate a 800g per 5 minuti e acquisite al citometro a flusso BD FACS CANTO II mediante software BD FACS DIVA.

4.3.3 SAGGIO DI PRODUZIONE CITOCHINICA

I linfo-monociti sono stati scongelati e lavati due volte con 4 mL di RPMI completo centrifugando a 400g per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato mediante aspirazione con pompa a vuoto. Il pellet è stato quindi risospeso in RPMI completo.

Per ogni individuo sono state stimulate 2×10^6 cellule risospese in 1 mL di RPMI completo per 22 ore a 37°C con 5 µg/ml di α CD3 (clone OKT3) fissato *overnight* su piastre da 96 pozzetti e con 1 µg/mL di α CD28 (clone CD28.2) solubile, in presenza di BD Golgi Stop (Monensina, cat. 554724). La stessa quantità di cellule è stata incubata senza stimolazione nelle stesse condizioni sperimentali come controllo.

Le cellule sono state lavate con 3 mL di PBS 1X, centrifugate a 400g a temperatura ambiente per 5 minuti e colorate con gli anticorpi extracellulari specifici per la caratterizzazione delle Treg (Tabella 3), incubate al buio per 30 minuti, quindi lavate con 3 mL di PBS 1X e centrifugate a 400g a temperatura ambiente per 5 minuti. Le stesse cellule sono state fissate e permeabilizzate con il BD kit Intrasure, seguendo le istruzioni della ditta produttrice, e marcate intracellularmente per 30 minuti al buio con gli anticorpi rivolti contro le citochine IL10, IL17-A e TGF Beta (Tabella 3).

I campioni sono stati quindi lavati con 2 mL di PBS 1X, centrifugati a 800g per 5 minuti e analizzati al citometro a flusso BD FACS CANTOII mediante software BD FACS DIVA.

<u>Colorazione extracellulare</u>		
<i>Anticorpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Clone</i>
α-CD3	V500	UCHT1
α-CD4	APC-H7	SK3
α-CD45RA	FITC	HI100
α-CD25	Pe-Cy7	2A3
α-CD127	PerCP-Cy5.5	HIL-7R-M21
<u>Colorazione intracellulare</u>		
<i>Anticorpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Clone</i>
α-IL17A	PE	SCPL1362
α-IL10	APC	JES3-19F1
α-TGF beta	eFluor450	FNLAP

Tabella 3. Anticorpo, fluorocromo e cloni utilizzati per marcare le cellule T regolatorie e le citochine da esse secrete.

4.3.4 QUANTIFICAZIONE DI CITOCHINE NEL SURNATANTE

Tre sottotipi di TGF beta (tipo 1, tipo2 e tipo 3) e tre citochine implicate nei pathway delle cellule T helper 17 (Interleuchina 21, CD40L e Interleuchina 17) sono state quantificate mediante la tecnologia Luminex (descritta sotto) utilizzando due kit Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad, cat.#171-W4001M e #LN000000IB), l'analizzatore MAGPIX (Bio-Rad) e il software Bio-Plex Manager 6.1.

La tecnologia Luminex è una metodica simile ai saggi ELISA che si basa sull'utilizzo di biglie magnetiche per la quantificazione contemporanea in un unico saggio di molteplici analiti.

Ogni biglia, di 6,5 μ m colorata con una particolare miscela di due coloranti fluorescenti, è coniugata con un anticorpo che riconosce specificamente un analita di interesse. La miscela dei due coloranti fluorescenti all'interno della biglia è diversa per ogni tipo di anticorpo analita-specifico. Una volta che l'anticorpo legato alla biglia riconosce la molecola di interesse, viene aggiunto il “*detection antibody*” biotinilato che crea un

complesso antigene-anticorpo di tipo “*sandwich*” che viene a sua volta legato dalla streptavidina-ficoeritrina che funziona da molecola reporter. La discriminazione dei diversi analiti in uno stesso saggio avviene mediante il passaggio delle microsfere attraverso due laser: un laser rosso (635nm), che eccita la specifica miscela di colorante all’interno delle biglie discriminando il preciso set di microsfere e quindi il tipo di analita, e successivamente un laser verde (532nm) che invece eccita la ficoeritrina sulla molecola reporter la cui intensità di fluorescenza media è proporzionale alla concentrazione dell’analita nel campione.

4.4 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

La valutazione dei principali parametri ematologici (Tabella 4) è stata effettuata mediante esame emocromocitometrico utilizzando l'analizzatore ematologico Coulter LH 700 (Beckman).

Tale strumento utilizza il principio impedenziometrico di Coulter in base al quale il numero e la dimensione di cellule sospese in una soluzione conduttiva viene determinata misurando i cambiamenti di resistenza elettrica causati dal loro passaggio attraverso un foro di piccole dimensioni. La cellula risospesa nel liquido funziona da isolante e quando attraversa il foro varia momentaneamente la resistenza del campo elettrico creato da due elettrodi posizionati ai due lati dell'apertura. Questo crea un impulso elettrico che può essere misurato, in quanto il numero di impulsi è proporzionale al numero di cellule presenti nella soluzione, mentre la dimensione dell'impulso è proporzionale al volume cellulare. La concentrazione dell'emoglobina del campione viene invece misurata per via fotometrica.

ACRONIMO	PARAMETRO EMATOLOGICO
WBC	conta leucocitaria
RBC	conta eritrocitaria
HB	concentrazione di emoglobina
MCV	volume medio degli eritrociti
MCH	quantità media di emoglobina per globulo rosso
LY%	% linfociti
MO%	% monociti
NE%	% granulociti neurofili
EO%	% granulociti eosinofili
BA%	% granulociti basofili

Tabella 4. Parametri bio-clinici misurati mediante esame emocromocitometrico.

4.5 QUANTIFICAZIONI DI MARCATORI SIERICI DI PROLIFERAZIONE, ATTIVAZIONE E INFIAMMAZIONE: sBAFF, sCD25, IL-6, MCP-1, PCR

I livelli sierici di quattro proteine solubili: BAFF, CD25, IL-6 ed MCP-1, sono stati quantificati in individui appartenenti alla coorte ProgeNIA mediante saggi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Questo tipo di quantificazione utilizza un anticorpo specifico per l'analita di interesse fissato ad un supporto solido di polistirene. Una volta che l'anticorpo lega la proteina e l'eccesso di anticorpo non coniugato viene eliminato mediante lavaggio, viene aggiunto un anticorpo coniugato con un enzima (solitamente *Horseradish peroxidase* HRP) che riconosce il complesso analita-anticorpo primario. Successivamente viene aggiunta la molecola substrato dell'enzima che sviluppa un segnale colorato o fluorescente proporzionale alla concentrazione dell'analita e che potrà essere rilevato mediante uno spettrofotometro.

1. sBAFF

I livelli sierici di BAFF solubile sono stati misurati mediante R&D Systems Quantikine ELISA Kit (cat.PDBLYS0B). Il saggio è stato condotto seguendo le istruzioni della casa produttrice.

2. sCD25

I livelli sierici di CD25 sono stati quantificati mediante kit OpteEIA set Human IL-2 sR α (BD, cat. 2644KI).

3. MCP-1 e Interleuchina 6

I livelli sierici di MCP-1 e IL-6 sono stati quantificati utilizzando 2 kit Quantikine High Sensitive Human Immunoassays (R&D Systems, Inc.) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

4. PCR

La proteina C reattiva è stata quantificata mediante turbidimetria utilizzando l'analizzatore A-25 BioSystems.

Tale metodo si basa su un'analisi ottica che permette di determinare il livello di torbidità di un liquido sfruttando l'assorbimento e la riflessione di raggi luminosi di una determinata lunghezza d'onda. In base al grado di deflessione del raggio luminoso in entrata è possibile calcolare la concentrazione dell'analita di interesse nel siero.

4.6 QUANTIFICAZIONE SIERICA DELLE IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE A, G, M ED E

Le immunoglobuline sieriche di tipo A, G ed M sono state analizzate utilizzando il metodo turbidimetrico e l'analizzatore A-25 BioSystems.

Le immunoglobuline di tipo E sono state quantificate mediante l'analizzatore automatico Immulite 2000. Il sistema Immulite 2000 utilizza piccole sfere in polistirene sulle quali l'anticorpo è fissato alla fase solida. Le singole sfere vengono erogate in una provetta di reazione speciale che serve come contenitore per i processi di incubazione, lavaggio e sviluppo del segnale. Dopo che il campione è stato incubato con un reagente marcato con fosfatasi alcalina, la miscela di reazione viene separata dalla sfera facendo ruotare la provetta di reazione ad alta velocità lungo l'asse verticale. A questo passaggio seguono dei lavaggi sequenziali al termine dei quali la sferetta non presenta alcun residuo di marcato non legato. La quantificazione dell'analita avviene grazie alla luce che si libera dal legame del substrato dioxetano alla fosfatasi alcalina presente sulla sferetta. La quantità di luce liberata è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione e verrà rilevata da un fotomoltiplicatore e calcolata dal sistema.

4.7 ANALISI STATISTICHE

Per capire in che misura il fumo di sigaretta influenzi i livelli quantitativi dei tratti esaminati, i dati sono stati inizialmente normalizzati mediante una trasformazione basata sui ranghi detta *inverse-normal* e successivamente è stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov per verificarne l'avvenuta normalizzazione. Sono stati quindi utilizzati diversi test statistici quali l'analisi della varianza e modelli di regressione lineare (corretti per sesso, età, età al quadrato e stagionalità) corroborati da test non parametrici quali il test di Kruskal-Wallis e di Wilcoxon.

Per determinare la significatività statistica, la classica soglia nominale di 0.05 è stata corretta per test multipli mediante il metodo di Bonferroni: considerato che i tratti quantitativi indipendenti testati nel presente studio sono 114 (95 tratti immunologici espressi in conta assoluta, 5 proteine sieriche, 4 classi immunoglobuliniche e 10 parametri ematologici), e 8 sono i test statistici condotti, i tratti sono stati considerati significativamente alterati dal fumo di sigaretta quando il P-value di ciascun test è risultato inferiore a $5.48E-5$. I tratti di interesse descritti nella sezione dei risultati sono significativi sia per il test parametrico che per quello non parametrico con P-value simile.

La determinazione della significatività statistica per quanto concerne i saggi di proliferazione e produzione citochinica è stata calcolata applicando il t-test.

5. RISULTATI

Dalla combustione di una sigaretta si libera una complessa miscela di sostanze tossiche, mutagene e carcinogene in grado di causare profonde alterazioni in diversi distretti dell'organismo, gli apparati cardiovascolare e respiratorio e il sistema immunitario risultano essere quelli maggiormente colpiti. Visti i numerosi effetti deleteri attribuiti al fumo abbiamo condotto la nostra indagine scientifica esaminando lo stato immunitario e infiammatorio di individui fumatori vs non fumatori.

Il numero di globuli bianchi (WBC-*White Blood Cells*) circolanti nel sangue periferico è uno dei principali parametri ematologici utilizzati per valutare lo stato di salute generale di un individuo, infatti un loro aumento o diminuzione potrebbe essere il sintomo di patologie più o meno gravi. È noto da tempo che il fumo di sigaretta determini un considerevole aumento dei livelli circolanti di WBC (Tollerud *et al.* 1989; Asif *et al.* 2013) e i nostri dati relativi agli esami emocromocitometrici lo hanno confermato ($P\text{-value} < 5.48E-5$). I fumatori inoltre hanno mostrato una maggiore concentrazione di emoglobina (*Haemoglobin*, Hb), più alti valori della quantità media di emoglobina (*Mean Corpuscular Hb*, MCH), e del volume corpuscolare medio del globulo rosso (*Mean Corpuscular Volume*, MCV).

Se l'emocromo ha permesso di avere un quadro generale dello stato di salute di un individuo, l'analisi del profilo immunologico mediante citofluorimetria ci ha dato una visione dettagliata del sistema immunitario e ci ha permesso di individuare le popolazioni cellulari i cui livelli vengono maggiormente alterati dal fumo di sigaretta. Infatti, l'immunofenotipizzazione condotta su larga scala (1,600 individui di cui 20% fumatori, 63% non fumatori e 17% ex-fumatori) ci ha permesso di confermare o identificare in

maniera robusta, rispetto a lavori precedenti, correlazioni tra fumo e aumentati livelli circolanti di diverse popolazioni leucocitarie. Inoltre, l'analisi contemporanea di circa 100 popolazioni leucocitarie ci ha permesso di determinare la popolazione linfocitaria che aumenta maggiormente a causa al fumo di sigaretta: le cellule T regolatorie. Queste ultime sono caratterizzate da un'elevata espressione della catena α del recettore dell'Interleuchina 2, e dalla non espressione del recettore per l'Interleuchina 7 (CD127), e sono implicate nel mantenimento della tolleranza periferica e nella risposta tumorale. All'interno di tale popolazione linfocitaria è però la sottoclasse delle Treg di memoria che si è dimostrata la più associata al fumo ($P\text{-value} < 5.48E-5$). I nostri risultati hanno inoltre evidenziato che il fumo di sigaretta determina una sovra-regolazione del CD25, sia nella sua forma di membrana (tutte le cellule T helper esprimenti alti livelli di CD25 aumentano nei fumatori), che nella sua forma solubile ($P\text{-value} < 5.48E-5$), come mostrato dai risultati ottenuti dalla quantificazione della proteina sierica CD25 nei volontari ProgeNIA.

Analogamente a ciò che abbiamo osservato nelle Treg, l'analisi degli stadi di maturazione dei linfociti T ha messo in luce che le cellule di memoria (CD45RA negative) sono molto più correlate al fumo rispetto agli altri stadi di maturazione sia nel compartimento dei linfociti CD4+ che in quello dei CD8+ ($P\text{-values} < 5.48E-5$).

Anche l'immunità umorale non è estranea a cambiamenti causati dal fumo, infatti i fumatori mostrano un considerevole aumento nel compartimento dei linfociti B ($P\text{-value} < 5.48E-5$) e in accordo con questo risultato, anche la quantificazione di BAFF solubile, citochina che promuove il differenziamento e la proliferazione di queste cellule, aumenta nei fumatori in maniera significativa. È interessante notare che anche le plasmacellule, sottogruppo di linfociti B che si occupano della produzione di immunoglobuline e che abbiamo caratterizzato in un ridotto sottogruppo di volontari (dati

non mostrati), aumentano nei fumatori. L'espansione di tale popolazione cellulare non è però accompagnata da un generale aumento della produzione anticorpale, infatti la quantificazione mediante turbidimetria delle immunoglobuline sieriche ha confermato dati noti in letteratura riguardo la riduzione sia delle immunoglobuline di classe A che di classe G ($P\text{-value} < 5.48E-5$) palesando una ridotta attività funzionale delle cellule B, in particolare modo delle plasmacellule. Le immunoglobuline di tipo M non hanno invece mostrato alcuna variazione significativa, in accordo con il loro ruolo di proteine di fase acuta nei processi infiammatori. Invece, in controtendenza rispetto alle altre immunoglobuline, la quantificazione delle immunoglobuline di classe E ha mostrato un loro aumento nei fumatori, ($P\text{-value} < 5.48E-5$). Tale aumento è noto da tempo (Holt 1987; Ferson *et al.* 1979; Roseman *et al.* 2012) e uno studio del 1994 ipotizza un meccanismo legato ad una maggiore produzione di Interleuchina 4 (IL4) citochina che causa uno *switching* isotipico a favore delle immunoglobuline di tipo E. Inoltre nello stesso lavoro i linfo-monociti dei fumatori stimolati con fitoemoagglutinina mostrano una maggiore produzione di IL4 rispetto ai controlli, e stratificando la coorte dei fumatori, la produzione di IL4 è direttamente proporzionale al numero di sigarette fumate (Byron *et al.* 1994).

L'impatto del fumo di sigaretta si ripercuote anche sulle principali cellule che presentano l'antigene: (*Antigen Presenting Cells*, APC): le cellule dendritiche ($P\text{-value} < 5.48E-5$). In particolare l'analisi citofluorimetrica ha mostrato che, in accordo con un lavoro del 2013 (Chen *et al.* 2013), all'interno di questa popolazione cellulare il sottogruppo delle plasmacitoidi, caratterizzate dall'espressione catena α del recettore dell'Interleuchina 3 (CD123), aumenta notevolmente nei fumatori ($P\text{-value} < 5.48E-5$), mentre la controparte di natura mieloide (positive per l'antigene di membrana CD11c o integrina αx) non varia in maniera significativa.

La valutazione della funzionalità cellulare effettuata confrontando 12 fumatori accaniti con 12 non fumatori, ha evidenziato una minore capacità proliferativa dei linfociti totali di individui fumatori in seguito a co-stimolazione per 72 ore con anti-CD3 e anti-CD28 ($P<0.05$) (Figura 3), mentre non è stata osservata alcuna differenza significativa nella proliferazione delle cellule T helper e delle Treg in particolare, probabilmente a causa della casistica limitata. Inoltre, l'analisi della produzione citochinica effettuata sul surnatante delle stesse cellule ha evidenziato una riduzione della secrezione di IL-21 da parte delle cellule dei fumatori ($P<0.05$) (Figura 4). L'IL21, citochina con proprietà pleiotropiche pro- e anti-infiammatorie e prodotta principalmente dai linfociti T CD4+, è in grado di attivare sia le cellule citotossiche che NK esercitando in questo modo una potente attività antitumorale (Ettinger *et al.* 2008). Nessuna differenza significativa è stata invece osservata per le altre citochine quantificate (Tabella 4).

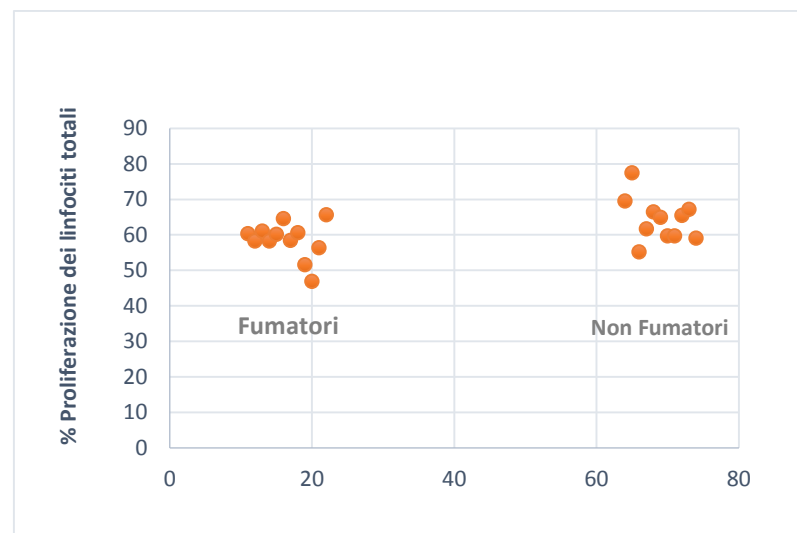


Figura 3. Percentuale di proliferazione dei linfociti totali in seguito a stimolazione dei PBMC con anti-CD3 e anti-CD28 per 72ore.

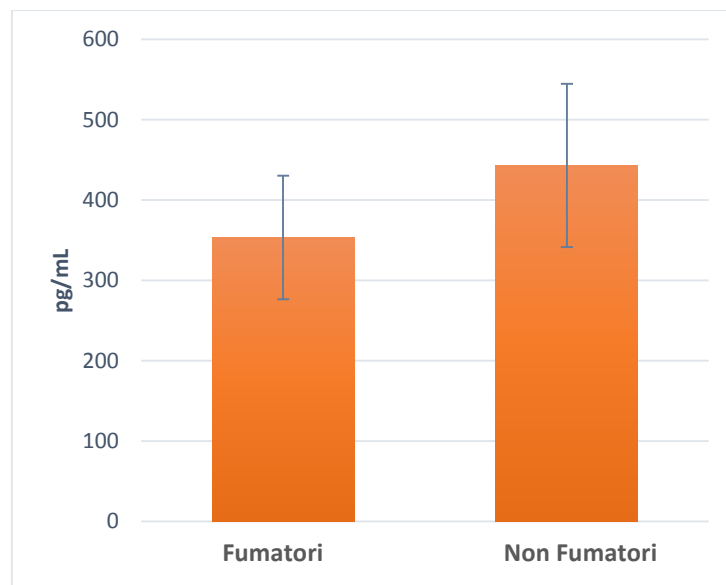


Figura 4. Produzione di IL21 nel surnatante in seguito a stimolazione dei PBMC con anti-CD3 e anti-CD28 per 72 ore.

<u>CITOCHINA</u>	<u>BIO-PLEX</u>
TGF-B1	1
TGF-B2	1
TGF-B3	1
IL-17F	2
IL-21	2
SCD40L	2

Tabella 4. Citochine quantificate mediante tecnologia Luminex nel surnatante in seguito a stimolazione di PBMC con anti-CD3 e anti-CD28 per 72 ore.

E' importante notare che, malgrado il fumo causi profondi cambiamenti a livello quantitativo nelle cellule circolanti del sistema immunitario, questa alterazione sembra essere reversibile, infatti l'analisi del profilo immunologico degli ex-fumatori ha evidenziato che smettere di fumare risolve questa generale leucocitosi riportando il sistema immunitario ad una condizione paragonabile a quello di individui che non hanno mai fumato (si riportano come esempio le sole cellule Treg, Figura 5).

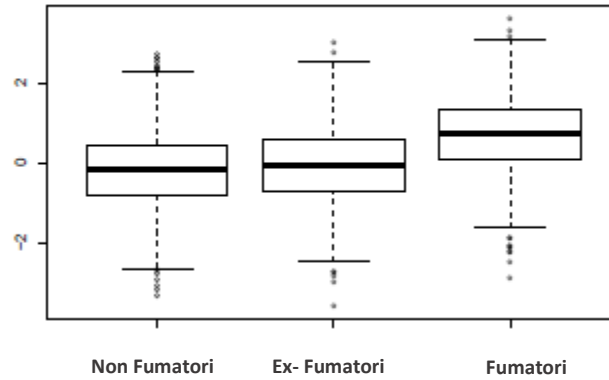


Figura 5. Box plot dei livelli di cellule T regolatorie nei non fumatori, ex-fumatori e fumatori.

L'inflammation è un meccanismo protettivo che ha lo scopo di distruggere o confinare un agente lesivo e di riparare il tessuto danneggiato. I nostri risultati evidenziano come il fumo di sigaretta sia in grado di modificare non solo l'architettura del sistema immunitario ma anche gli esiti di un processo infiammatorio. In effetti è noto che il fumo attivi il rilascio in circolo di mediatori dell'inflammation (Yanbaeva *et al.* 2007), alcuni dei quali considerati marcatori di rischio cardiovascolare. L'analisi del profilo infiammatorio dei volontari, ha confermato dati già descritti in letteratura (Bermudez *et al.* 2002) che evidenziano nei fumatori una condizione di inflammation vascolare che si manifesta con più alti livelli di IL6, MCP-1 (P-value<5.48E-5) e PCR (non significativo), rispetto ai non fumatori.

6. DISCUSSIONE

La dissezione fine del profilo immunologico descritta nella presente tesi ha dimostrato che il fumo di sigaretta altera in maniera profonda l'architettura del sistema immunitario suggerendo il suo contributo nelle patologie a carico del sistema immune, come le malattie autoimmuni, e non solo nelle patologie notoriamente fumo-correlate quali, malattie cardiovascolari e respiratorie (Gonçalves *et al.* 2011; Yanbaeva *et al.*, 2007).

La generale leucocitosi che si manifesta nei fumatori è un sintomo sistemico difficile da dissezionare, il nostro approccio che ha preso in considerazione numerosi sottogruppi cellulari, ha portato alla identificazione delle Treg e nello specifico delle Treg di memoria quale popolazione cellulare che aumenta maggiormente nei fumatori. Le Treg sono le cellule del sistema immunitario che si occupano della tolleranza periferica prevenendo fenomeni autoimmuni e malattie infiammatorie croniche, tuttavia limitano l'immunità anti-tumorale (Sakaguchi *et al.* 2001). Miyara nel 2009 descrisse le Treg di memoria come formate da due sottoclassi di Treg, le cellule “*secreting*” e le cellule “*activated*”. Le due sottopopolazioni cellulari vengono distinte fenotipicamente per una diversa espressione dell'antigene CD25 (maggiore nelle Treg attivate rispetto alle secreting) e funzionalmente per una attività proinfiammatoria delle cellule secretorie rispetto a quella immunomodulante delle attivate, anche se in realtà questa visione ben distinta dell'attività cellulare risulta troppo rigida per descrivere due popolazioni così fenotipicamente simili. Infatti esperimenti condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che dopo stimolazione le cellule Treg descritte come pro-infiammatorie erano in grado di produrre anche citochine anti-infiammatorie così come le Treg con presunta attività immunomodulante producevano citochine proinfiammatorie (dati non mostrati). In questo contesto è giusto quindi

considerare queste cellule come unità “plastiche” in grado di adattare le proprie funzioni alle necessità fisiologiche dell’organismo, dove popolazioni così fenotipicamente simili lo sono anche sotto l’aspetto funzionale. Per questo motivo interpretare l’effetto del fumo su queste popolazioni cellulari risulta complicato. In effetti è facile pensare che l’aumento numerico delle Treg sia accompagnato anche da una maggiore soppressione del sistema immunitario “frenandolo” nel controllo anti-tumorale, e permettendo quindi una situazione favorevole allo sviluppo di tumori. Tuttavia lo sviluppo dei tumori nei fumatori non è un fenomeno generalizzato, ma insorge prevalentemente in tessuti e organi che vengono direttamente a contatto con le sostanze tossiche che compongono il fumo di sigaretta (es. adenocarcinoma polmonare, tumori alla vescica ecc) (Crofton *et al.* 1989; Boyle *et al.* 1997, Ng *et al.* 2006. Lee *et al.* 2015). È possibile quindi immaginare uno scenario completamente opposto, dove l’aumento numerico delle Treg nel sangue periferico possa essere dato da un meccanismo di feedback causato da una funzionalità cellulare ridotta. Infatti l’aumento delle Treg meno “performanti” nel sopprimere il sistema immunitario, potrebbe favorire in individui predisposti, l’insorgenza di fenomeni infiammatori cronici e autoimmuni. A supporto di questa ipotesi, numerose evidenze scientifiche riportano che una riduzione numerica delle Treg o della loro capacità soppressoria sia caratteristica di alcune patologie autoimmuni come la sclerosi multipla (Sakaguchi *et al.* 2006; Viglietta *et al.* 2004, Carbone *et al.* 2014) dato confermato anche dal nostro gruppo di ricerca che ha individuato una variante del DNA predisponente per la sclerosi multipla che riduce i livelli circolanti proprio delle Treg di memoria (dati non mostrati). L’aumento della casistica e studi funzionali mirati allo studio della capacità immunosoppressiva delle Treg potranno essere utili per chiarire l’effetto del fumo sulla loro funzionalità, inoltre lo studio del profilo trascrizionale di queste cellule potrà mettere in evidenza i geni maggiormente implicati in questa disregolazione.

Anche l'aumento delle cellule B e la riduzione delle immunoglobuline di tipo G ed A nel siero dei fumatori suggerisce una minore capacità dei linfociti B di produrre anticorpi supportando l'ipotesi di una ridotta funzionalità linfocitaria generalizzata.

Malgrado il fumo sia considerato un fattore di rischio per diverse patologie autoimmuni, tra cui il lupus eritematoso sistemico (Costenbänder *et al.* 2004; Healy *et al.* 2009; Hernan *et al.* 2005), patologia notoriamente caratterizzata ipergammaglobulinemia (Lin *et al.* 2009; Kay *et al.* 1988), i nostri risultati mostrano che il fumo causi una riduzione delle immunoglobuline di tipo G e di tipo A (Ferson *et al.* 1979; Holt *et al.* 1987; Gonzales-Quintela *et al.* 2007). Questa apparente incongruenza potrebbe trovare spiegazione nel fatto che il fumo di sigaretta, aerosol eterogeneo di molecole con proprietà tossiche differenti, causi un aumentato rischio per autoimmunità attraverso meccanismi non necessariamente legati alla produzione immunoglobulinica, ad esempio liberando specie reattive dell'ossigeno o alterando la presentazione antigenica da parte delle APC (Vassallo *et al.* 2005). In effetti l'autoimmunità è il risultato di un'interazione complessa tra geni e ambiente e il fumo di sigaretta aggiunge un ulteriore grado di complessità in quanto potrebbe contribuire alla predisposizione per specifiche patologie con alcuni meccanismi ed essere al contempo protettivo con altri. Un esempio è dato proprio dalla nicotina che, come descritto nell'introduzione, è in grado, grazie alle sue proprietà immunomodulanti, di ridurre l'infiammazione a livello del SNC nei modelli murini di sclerosi multipla (Shi *et al.* 2009; Gao *et al.* 2014). La comprensione di questi meccanismi aggiungerebbe un tassello importante nel complesso mosaico rappresentato dal contributo dei fattori ambientali per la predisposizione per autoimmunità.

In conclusione, possiamo affermare che l'architettura del sistema immune venga pesantemente alterata dal fumo, accendendo una bomba ad orologeria potenzialmente

capace di devastare la salute dell'organismo e in cui l'unico artificiere efficace è l'uomo e le sue scelte.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arnson Y. *et al.* "Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity." *J. of Autoimmunity* 2010; Volume 34, 258-265.
- Asif M. *et al.* Effect of cigarette smoking based on hematological parameters: comparison between male smokers and nonsmokers. *Turk J Biochem* 2013; 38 (1); 75–80.
- Benowitz N.L. "Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence." *NIDA Res. Monogr.* 1990; 99:12–29.
- Benowitz N.L. *et al.* "Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 268(1):296–303.
- Benowitz N.L. *et al.* "Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers." *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 192, 29-60.
- Bermudez E.A. *et al.* "Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women." *American J. of Cardiology*, 2002; Volume 89, Issue 9, 1117-1119.
- Bijl M. *et al.* "Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes." *Europ. Journal of Clin. Invest.* 2001; 31: 550-553.
- Boyle P. "Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996." *Lung Cancer* 1997; 17:1–60.
- Byron K.A. *et al.* "IL-4 production is increased in cigarette smokers." *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 95:333-336.
- Carbone F. *et al.* "Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease", *Nature Medicine* 2014; 20, 69–74.
- Chen X.Q. *et al.* "Comparative analysis of dendritic cell numbers and subsets between smoking and control subjects in the peripheral blood." *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6(2): 290-296.
- Costenbader K.H. *et al.* "Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta analysis." *Arthritis Rheum.* 2004; 50:849-857.
- Costenbader K.H. and Karlson E.W. "Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology?" *Lupus.* 2006; 15: 737–745.
- Crofton J. *et al.* "Smoking as a risk factor for chronic airways disease." *Chest.* 1989; 96 (3 suppl):307S–312S.
- De Boer W.I. *et al.* "Monocyte chemoattractant protein 1, Interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD." *J. Pathol.* 2000; 190 619-626.
- De Jonge W.J. *et al.* "The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation." *Br. J. Pharmacol.* 2007; 151:915–929.

Diana G. “La storia del tabacco in Italia. Introduzione e diffusione del tabacco dal 16° secolo al 1860” *Il Tabacco*, 1999; 7(2), 55-62.

Doll R. and Hill A.B. “The Mortality Of Doctors In Relation To Their Smoking Habits- A Preliminary Report.” *British Medical J.* 1954; 1451-1455.

Doll R. *et al.* “Mortality in relation to smoking: 50 years’ observations on male British doctors.” *BMJ* 2004.

Ettiger R. *et al.* “The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease”. *Immunological Reviews* 2008; Vol. 223: 60–86.

Ferson M. *et al.* “Low natural-killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects.” *Int. J. Cancer* 1979; 23, 603–609.

Friend K.B. *et al.* “Smoking rates and smoking cessation among individuals with multiple sclerosis.” *Disabil. Rehabil.* 2006; 28: 1135–41.

Fujii T. “An independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its roles in regulation of immune function.” *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2004; 123, 179– 188.

Gao Z. *et al.* “The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Disease Course Is Modulated by Nicotine and Other Cigarette Smoke Components.” *PLoS ONE* 2014; 9(9): e107979.

Geng Y. *et al.* “Effects of nicotine on the immune response.II. Chronic nicotine treatment induces T-cell anergy.” *J. Immunol.* 1996; 156, 2384–2390.

Gonçalves R.B. *et al.* “Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms.” *Inflammation Research* 2011; 60 (5), 409–424.

Gonzalez-Quintela A. *et al.* “Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities.” *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 151: 42–50

Gori G.B. *et al.* “Mouth versus deep airways absorption of nicotine in cigarette smokers.” *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 25(6):1181–1184.

Grimaldi C.M. *et al.* “Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation.” *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 1625e33.

Hawkes C.H. “Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis.” *Mult. Scler.* 2007; 13: 610–5.

Healy B.C. *et al.* “Smoking and disease progression in multiple sclerosis” *Arch Neurol.* 2009 Jul; 66(7):858-64.

Hernan M.A. *et al.* “Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis.” *Brain* 2005; 128:1461e5.

Holberg C.J. *et al.* “Child day care, smoking by caregivers and lower respiratory tract illness in the first 3 years of life.” *Pediatrics* 1993; 91, 885–892.

Holt P.G. & Keast D. "Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals." *Bacteriol. Rev.* 1977; 41, 205–216

Holt P.G. *et al.* "Immune and inflammatory functions in cigarette smokers." *Thorax* 1987. 42, 241-219

Hutchinson D. *et al.* "Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA." *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60:223-227.

Jaakkola M.S. e Jaakkola J.J.K. "Assessment of exposure to environmental tobacco smoke." *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 2384–2397

Johnson G.J. *et al.* "Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2005; 21: 921–31.

Kalra R. *et al.* "Effects of cigarette smoke on the immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive calcium stores." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 293, 166–171.

Kay R.A. *et al.* "An IgG subclass imbalance in connective tissue disease." *Ann Rheum Dis.* 1988; 47:536–541.

Kalra R. *et al.* "Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11: 563–8.

Klareskog L. *et al.* "A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination." *Arthritis Rheum* 2006; 54:38-46.

Kode A. *et al.* "Differential effects of cigarettes smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells." *Resp. Res.* 2006; 7: 132

Kuo Y. *et al.* "Differential expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in fetal and neonatal mouse thymus." *J. Neuroimmunol.* 2002; 130, 140–154.

Kuper H. *et al.* "Tobacco use, cancer causation and public health impact." *J. Intern. Med.* 2002; 251: 455-466.

Lawrence T. "The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation." *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009; 1:a001651.

Lee H.W. *et al.* "Cigarette side-stream smoke lung and bladder carcinogenesis: Inducing mutagenic acrolein-DNA adducts, inhibiting DNA repair and enhancing anchorage-independent-growth cell transformation." *Oncotarget* 2015; Vol. 6, No. 32: 33227-33236.

Levin E.D. & Simon, B. B. "Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals." *Psychopharmacology* 1998; 138, 217–230.

Levin E.D. *et al.* Cancer and Tobacco smoking, A preliminary report. *J.A.M.A.* 1950, 143, 336-338.

- Lin G. *et al.* "IgG subclass serum levels in systemic lupus erythematosus patients" Clin Rheumatol. 2009; 28:1315–1318.
- Maunder H. *et al.* "Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke in vitro." Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol Physiol 2007; 292:L1248e56.
- McCarty MF. "Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: downregulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline." Med Hypotheses 1999; 52: 465–77.
- Mehta H. *et al.* "Cigarette smoking and innate immunity" Inflamm. Res. 2008, 57 497–503.
- Mellman I. *et al.* "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell 2001; 106:255-258.
- Mian A.M. *et al.* "Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke." J. Leukoc. Biol. 2008; 83, 774-784.
- Mian M.F. *et al.* "Cigarette smoke attenuation of poly I: C-induced innate antiviral responses in human PBMC is mainly due to inhibition of IFN β production." Mol Immunol 2009; 46:825e9.
- Mian M.F. *et al.* "Exposure to cigarette smoke suppresses IL-15 generation and its regulatory NK cell functions in poly I: C-augmented human PBMCs." Mol Immunol 2009; 46:3108e16.
- Mio T. *et al.* "Cigarette smoke induces interleukin 8 release from human bronchial epithelial cells." Am. J. Respir Crit Care Med 1997; 15:1770-1776.
- Miyara M. *et al.* "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4 $^{+}$ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." Immunity 2009; 30, 899–911.
- Ng S.P. *et al.* "Effects of prenatal exposure to cigarette smoke on offspring tumor susceptibility and associated immune mechanisms." Toxicol. Sci. 2006; 89, 135-144.
- Nizri E. *et al.* "Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses." J Immunol 2009; 183:6681–6688.
- Orrù V. *et al.* "Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease." Cell 2013; 155(1), 242-256.
- Pankow J.F. "A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract." Chem Res Toxicol 2001; 14(11):1465–1481.
- Parikh A. *et al.* "Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states." Hepatology 2001; 33:16e21.
- Parkin J. and Cohen B. "An overview of the immune system." The Lancet 2001; Volume 357 1777-1789.

- Piao W.A. *et al.* "Nicotine and inflammatory immunological disorders." *Acta Pharmacol. Sin.* 2009; 30 (6): 715-722.
- Pilia G. *et al.* "Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians." *PLoS Genet* 2006; 2, e132.
- Pryor W.A. *et al.* "Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage." *Chem Res Toxicol* 1998; 11:441e8.
- Rennard S.I. "Cigarette smoke in research." *Am. J. Respir. Cell mol. Biol.* 2004; Volume 31 479-480.
- Reynolds H.Y. "Bronchoalveolar lavage." *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135, 250–263.
- Robbins C.S. *et al.* "Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice." *J. Immunol.* 2008; 180 6623-8.
- Rodriguez J.W. *et al.* "Maternal exposure to benzo[a]pyrene alters development of T lymphocytes in offspring." *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1999; 21, 379–396.
- Roseman C. *et al.* "The effect of smoking and alcohol consumption on markers of systemic inflammation, immunoglobulin levels and immune response following pneumococcal vaccination in patients with arthritis." *Arthritis Res Ther* 2012; 14:R170.
- Russell R.E. *et al.* "Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteines, and serine proteases." *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002; 283. L867-L873.
- Sakaguchi S. *et al.* "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol. Rev* 2001; 182:18–32.
- Sakaguchi S. *et al.* "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol.*" *Rev.* 2006; 212, 8–27.
- Sallusto F. *et al.* "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* 1999; 401, 708–712.
- Shi F.D. *et al.* "Nicotinic attenuation of Central Nervous System inflammation and autoimmunity." *J Immunol* 2009; 182: 1730-1739
- Shoenfeld Y. *et al.* "The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases" *Isr Med Assoc J* 2008; 10:8e12.
- Skok M.V. *et al.* "The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation." *Life Sci* 2007; 80:2334–2336.
- Sopori M.L. *et al.* "Effects of tobacco smoke on the immune system." in *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, 2nd ed.1994 (Dean JH, Luster MI, Munson AE and Kimber I eds) pp 413–434, Raven Press, New York.
- Talhout E. *et al.* "Hazardous Compounds in Tobacco Smoke." *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2011; 8, 613-628.

- Tashkin D.P. *et al.* "The UCLA population studies of chronic obstructive respiratory disease. VII. Relationship between parental smoking and children's lung function." *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 129, 891–897.
- Tollerud D.J. *et al.* "The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy Caucasians." *Am. Rev Respir. Dis.* 1989; 139, 1446-51.
- Toyabe S. *et al.* "Identification of nicotinic acetylcholine receptors on lymphocytes in the periphery as well as thymus in mice." *Immunology* 1997; 92, 201–205.
- Vassallo R. *et al.* "Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cells function leading to preferential induction of Th-2 priming." *J Immunology* 2005; 175, 2684-2691.
- Viglietta V. *et al.* "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." *J. Exp. Med.* 2004; 199, 971–979.
- Volpato S. *et al.* "Cardiovascular disease, Interleukin-6, and risk of mortality in older women, the women's health and aging study" *Circulation.* 2001; Feb 20; 103(7):947-53.
- World Health Organization Fact sheet N°339 Maggio 2014.
- Wynder E.L. and Graham E.A. "Tobacco Smoking as a Possible Etiologic Factor in Bronchiogenic Carcinoma: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases" *J.A.M.A.* 1950; 143, 329-336.
- Yanbaeva D.G. *et al.* "Systemic effects of smoking." *Chest* 2007; 131 (5), 1557–1566.